スクラッチ法によるカンキツグリーニング病の迅速診断法							
【要約】ヨウ素デンプン反応を利用したスクラッチ法により，葉 1 枚あたり約 2 分でカンキツグリーニング病の一次診断が可能である．							
沖縄県農業試験場・病理研究室				連絡先	098-840-8504		
部会名	園芸	専門	作物病害	対象	カンキツ	分類	普及
普及対象地域	沖縄全域のカンキツ栽培地域						

［背景・ねらい］

特定重要病害であるカンキツグリーニング病（HLB 病）は，県内全域で発生が拡大しており，有効な登録農薬がない現在，防除対策として罹病樹の早期発見と伐採が重要である．本病の葉病徴は要素欠乏症状と類似し，肉眼による識別が困難なため診断は主に遺伝子抽出による PCR 法が用いられている．しかし PCR 法は熟練を要し，試薬類のコストが制限要因となり実施可能機関が限られる．また核酸抽出から判定までに時間がかかり，伐採まで罹病樹を長期間放置することもあった．そのため，より効率的な防除のための迅速診断技術の開発が急務となっている．そこで本研究では，HLB 罹病葉にデンプンが異常蓄積する特性を利用し，生産現場で容易に一次診断ができる迅速診断法（スクラッチ法）の開発を行った．

［成果の内容・特徴］

1．スクラッチ法は，耐水性サンドペーパー（1 × 2cm　♯ 120），ヨウ素溶液（0.05M），水（水道水），ビニールパック，判定用白紙カードを使用する（表 1，図 1）．
2．1 × 2cm に切り取ったサンドペーパーで葉表を 20 回程度こすり，ビニールパックに入れ，水を 6 滴（約 1ml)添加する．サンドペーパーに付着した表皮組織を水に馴染ますように数回もみ，その後ヨウ素溶液を 1 滴添加する．判定は黄色または橙色が陰性，こげ茶または黒色が陽性となる（図 2，図 3）．
3．葉 1 枚あたりの検定時間は約 2 分である（図 2）．
4．要素欠乏症状および *Citrus tatter leaf virus*（CTLV），*Hop stunt virioid*（HSVd）感染葉における陽性反応はみられない（データ省略）．
5．現地タンカン園でのスクラッチ法と PCR 法との一致率は，樹ならびに葉あたりともに 90%以上の高い値であった（表 2）．

［成果の活用面・留意点］

1．検定キットにより，生産現場での一次診断として利用できる．
2．肉眼診断により特徴的症状（7 症状）の明瞭な葉を採取し検定する．
3．ヨウ素溶液添加後は即座に判定する．
4．ヨウ素溶液は暗所で保管する．
5．判定は白紙または白いボード上で行う．
6．1 樹または 1 枝より必ず複数枚（4 枚以上）検定し総合的に判定する．判定が判然としない場合は PCR を併用して行う．

［具体的データ］

表1　検定キット内容

品　名	量・数
1.　耐水性サンドペーパー（1×2cm　120番）	21枚
2.　ヨウ素溶液（0.05mol/L）	20ml
3.　水（水道水）	30ml
4.　ビニールパック	20枚
5.　判定用白紙カード	1枚
6.　取扱説明書	1枚

図1　検定キット

1．葉表をあらかじめ1×2cmの大きさに切った耐水性サンドペーパー（＃120）で20回程度擦る。その際、葉を破らない程度の強さで表面を削るように擦る。

↓

2．サンドペーパーをビニールパックに入れ、1ml水をいれる。その際、サンドペーパーに付着した表皮組織を水に溶かすように、数回もむ。

↓

3．ヨウ素溶液を1滴（約25μl）添加する。

↓

4．判定。染色の有無で判定する。判定は、白紙の上で行う。

葉1枚あたりの検定時間 約2分

図2　スクラッチ法検定手順

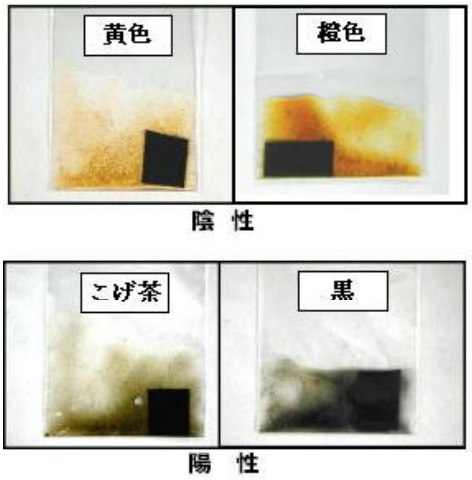

図3　判定結果

表2　現地タンカン園におけるスクラッチ法とPCR法によるカンキツグリーニング病の検定比較

	調査樹数	品種	症状	調査葉数	陽性(+) PCR	陽性(+) ｽｸﾗｯﾁ	陰性(-) PCR	陰性(-) ｽｸﾗｯﾁ	擬陽性(±) PCR	擬陽性(±) ｽｸﾗｯﾁ	不一致樹数	不一致葉数	PCRとの一致率(%) 樹あたり	PCRとの一致率(%) 葉あたり
うるま市	24	ﾀﾝｶﾝ	なし	23	0	0	23	23	0	0	2	3	**91.7**	**96.2**
			退緑	25	1	2	24	23	0	0				
			脈間黄化	23	1	1	22	22	0	0				
			黄化	7	2	2	5	4	0	1				
石垣市	7	ﾀﾝｶﾝ	なし	5	0	0	5	5	0	0	0	2	**100.0**	**90.0**
			退緑	8	1	1	7	6	0	1				
			まだら退緑	3	3	3	0	0	0	0				
			脈間黄化	2	0	0	2	2	0	0				
			黄化	2	0	0	2	2	0	0				

［その他］

研究課題名：病害虫総合防除対策事業

予算区分：国庫

研究期間：継　1997～

研究担当者：澤岻哲也・豊里哲也・河野伸二・大城篤・上原美歌

発表論文等：日本植物病理学会報 73(1):1-8,2007，実用新案 3122265 号,2006